

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Keller

Untersuchungen über das Vorkommen virulenter

Tuberkelbakterien in Butter

im Vergleich zu deren Phosphatasegehalt

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

bei der

Veterinär-Medizinischen Fakultät

der

Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von

GEORG WUTTKE

Tierarzt aus Posen

Gießen 1957

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Keller

Untersuchungen über das Vorkommen virulenter

Tuberkelbakterien in Butter

im Vergleich zu deren Phosphatasegehalt

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

bei der

Veterinär-Medizinischen Fakultät

der

Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von

GEORG WUTTKE

Tierarzt aus Posen

Gießen 1957

Mit Genehmigung
der Veterinär-Medizinischen Fakultät zu Gießen

Dekan: Professor Dr. R. Wetzel

Berichterstatter: Professor Dr. H. Keller

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 1957

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	7
B. Inhalt	8
a) die Tuberkulosekrankheit im Kindesalter	8
b) das Tierfutter	12
c) das Tierfutter und die Tuberkulose	12
C. Hauptteil	15
I. Einleitung	15
II. Die Tuberkulose im Kindesalter	16
a) Meiner Mutter, meinem Vater († 1954)	16
b) und meiner Frau	17
c) in Dankbarkeit gewidmet	17
III. Die Tuberkulose im Kindesalter	18
a) Die Tuberkulose im Kindesalter	18
b) Die Tuberkulose im Kindesalter	19
c) Die Tuberkulose im Kindesalter	20
d) Die Tuberkulose im Kindesalter	21
e) Die Tuberkulose im Kindesalter	22
f) Die Tuberkulose im Kindesalter	23
g) Die Tuberkulose im Kindesalter	24
h) Die Tuberkulose im Kindesalter	25
i) Die Tuberkulose im Kindesalter	26
j) Die Tuberkulose im Kindesalter	27
k) Die Tuberkulose im Kindesalter	28
l) Die Tuberkulose im Kindesalter	29
m) Die Tuberkulose im Kindesalter	30
n) Die Tuberkulose im Kindesalter	31
o) Die Tuberkulose im Kindesalter	32
p) Die Tuberkulose im Kindesalter	33
q) Die Tuberkulose im Kindesalter	34
r) Die Tuberkulose im Kindesalter	35
s) Die Tuberkulose im Kindesalter	36
t) Die Tuberkulose im Kindesalter	37
u) Die Tuberkulose im Kindesalter	38
v) Die Tuberkulose im Kindesalter	39
w) Die Tuberkulose im Kindesalter	40
x) Die Tuberkulose im Kindesalter	41
y) Die Tuberkulose im Kindesalter	42
z) Die Tuberkulose im Kindesalter	43

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	7
B. Schrifttum	9
a) zu Tuberkelbakterien in Butter	9
b) zum Tierversuch	12
c) zum Phosphatase-Nachweis	12
C. Eigene Untersuchungen	15
I. Arbeitsauftrag	15
II. Herkunft des zu untersuchenden Materials . . .	16
III. Methodik	16
Phosphatasebestimmung	17
Tierversuch	17
Kulturversuch	18
Nährbodenrezept	19
Technik des Beimpfens der Nährböden . . .	20
IV. Vorversuch	20
Tabelle	22
V. Hauptversuch	23
Tabelle	23
VI. Auswertung der Versuchsergebnisse	27
VII. Schlußfolgerungen	29
D. Literaturverzeichnis	31

A. Einleitung

Auf dem 13. Kongreß der Internationalen Union gegen die Tuberkulose in Madrid im Jahre 1954 hat der Ausschuß für Tiertuberkulose festgestellt, daß die Rindertuberkulose in vielen Ländern die Volksgesundheit ernstlich gefährdet. (Tuberkulose-Jahrbuch 1953/54) (47). Damit werden die Angaben aus dem Tuberkulose-Jahrbuch 1950/51 und 1951/52 bestätigt, in denen W a g e n e r (49) (50) auf Grund seiner Untersuchungen nachweist, daß rund 10 % der an Tuberkulose erkrankten Menschen durch Rindertuberkelbakterien infiziert sind. G o e r t t l e r u. W e b e r (15) haben das internationale Schrifttum in übersichtlichen Tabellen zusammengestellt und bestätigen die Angaben von W a g e n e r.

Nach K l i m m e r - S c h ö n b e r g (24) und anderen Autoren werden die Rindertuberkelbakterien auf den Menschen hauptsächlich durch Genuß erregerrhaltiger Lebensmittel übertragen. Dabei spielen nach K l i m m e r - S c h ö n b e r g Milch und Milcherzeugnisse eine besondere Rolle.

Über die Butter als Infektionsquelle des Menschen ist im tierärztlichen Schrifttum noch wenig bekannt. Daher hat mich Herr Professor Dr. Keller beauftragt, im Rahmen einer Dissertation Untersuchungen über den Gehalt der Markenbutter an Tuberkelbakterien durchzuführen.

B. Schrifttum

a) Wie bereits erwähnt, sind nach Klimmer-Schönberg die Milch und deren Erzeugnisse als eine der Infektionsquellen des Menschen für Rindertuberkulose anzusehen.

Im allgemeinen gelangt die Milch nach molkereimäßiger Verarbeitung an den Verbraucher. Untersuchungen solcher Milch haben nach Blindow (5), Eikmeier (13), Greve (16), Maas und Blum (27), Meyn (29), Munz (31), Schönberg (41), Wagener u. Eberhardt (52) sowie nach Wagener u. Reuß (53) ergeben, daß die Milchpasteurisierung nicht in allen Fällen ausreicht, die Tuberkelbakterien abzutöten. Kemkes (22) stellt hierzu fest, daß die Pasteurisierung kein „Allheilmittel“ sei.

Nachdem Eikmeier das Überleben der Tuberkelbakterien in molkereimäßig behandelte Milch auf Bedienungsfehler der Erhitzungsapparaturen zurückführen konnte, hat Schönberg die zwingende Notwendigkeit der Ausstattung der Milcherhitzer in Molkereien mit automatischen Temperaturreglern und Umschaltvorrichtungen gefordert, und Buss (8) unterstützt auf Grund des Nachweises von lebenden Tuberkelbakterien in pasteurisierter Trinkmilch diese Forderung.

Larmola (26) und Herzer (17) haben den Nachweis erbringen können, daß es Tuberkelbakterien-Stämme gibt,

die gegen eine Temperatureinwirkung von 75 bis 76° C resistent sind. Domagk (11) hat mitgeteilt, daß er einen Tuberkelbakterien-Stamm gefunden habe, der eine 15 Minuten lange Erhitzung auf 85° C überlebt habe. Die Untersuchungen von Bingel (4) haben ergeben, daß bei Hoch- und Dauererhitzung die Tuberkelbakterien mit Sicherheit durch die Erhitzungsgeräte abgetötet werden, während dies bei der Kurzzeiterhitzung nicht in vollem Maße zutrifft.

Dagegen haben die Untersuchungen von Ehrlich (12), Seelemann (42), Seelemann, Pilz u. Meyer (44) sowie von Trendtel (46) ergeben, daß die Pasteurisierung der Milch als Maßnahme zur Abtötung der Tuberkelbakterien vollkommen ausreicht.

Wenn schon nach den Untersuchungsergebnissen der erstgenannten Autoren die pasteurisierte Milch lebende Tuberkelbakterien enthalten kann, so trifft das auch für die Milcherzeugnisse zu. Dieses ergibt sich aus den in jüngster Zeit veröffentlichten Arbeiten von Albus (1), Kästli u. Binz (19), Keller u. Albus (21), Kollmann (25) sowie aus dem Lehrbuch von Klimmer-Schönberg, in dem die Untersuchungsergebnisse von Kliewe und Schuppener (23) zitiert werden.

Wie bereits erwähnt, ist über den Gehalt der Butter an lebenden Tuberkelbakterien im tierärztlichen Schrifttum nicht viel bekannt. Nach Klimmer-Schönberg können Tuberkelbakterien in infektionstüchtigem Zustand in den Molkereiprodukten enthalten sein. Man fand 3% der untersuchten Butterproben erregertaltig. Die Infektionstüchtig-

keit der bovinen Tuberkelbakterien darin bleibt nach den Angaben dieses Lehrbuches 21 Tage lang erhalten.

Nach Brugsch (6) muß mit einem bestimmten Bakteriengehalt in Butter und Käse, die aus Rohmilch, nicht aber aus Vorzugsmilch hergestellt sind, gerechnet werden. Der genannte Autor führt jedoch aus, daß bei der Verarbeitung dieser Milchprodukte ein Großteil der Erreger beim Zentrifugieren der Milch ausgeschleudert wird, so daß die Butter ärmer an Tuberkelbakterien ist als die fettfreie Milch und das Sediment. Im Gegensatz zu den Angaben von Brugsch steht die Ansicht von Kästli (18), wonach „es in Rahm und in Butter sogar zu einer gewissen Anreicherung der Tuberkelbakterien kommt, da diese offenbar den Fettkügelchen anhaften“ sollen. Seiffert (45) bestätigt die Angaben von Kästli, wenn er feststellt, daß die Tuberkelbakterien zu 75 % beim Zentrifugieren in den Rahm übergehen. Sie sollen durch den Auftrieb mit den spezifisch leichteren Milchkügelchen nach Innen gerissen werden. Roth (40) hat mit käuflicher Marktbutter durch intraperitoneale Verimpfung an Meerschweinchen nachgewiesen, daß diese mit virulenten Erregern behaftet war. Brusafero (7) fand ebenfalls durch Tierversuche 10 % der von ihm untersuchten Butterproben erregerrhaltig. Den krassesten Beweis erbrachte Obermüller (33) durch seine Versuche mit Marktbutter in Berlin. Er gibt ein positives Ergebnis in sämtlichen Butterproben an. Auch Petri (34) stellte fest, daß mit der Butter Tuberkelbakterien übertragen werden können; 30 % seiner untersuchten Proben enthielten den Erreger, während die 60 % den Tuberkelbakterien ähnliche Stäbchen aufwiesen, die zu Fehldiagnosen Anlaß gaben. Rabin-

witsch (38) dagegen konnte die Angaben der vorstehend genannten Autoren nicht bestätigen. Die 80 von ihr untersuchten Butterproben waren erregerefrei. Allerdings waren in 23 Fällen in der Butter apathogene Mycobakterien enthalten. Markl (28) kam zu ähnlichen Ergebnissen wie Rabinowitsch. Pettersson (35) konnte nachweisen, daß Tuberkelbakterien in ungesalzener Süßrahmbutter noch 4 Wochen nach künstlicher Beimpfung infektionsfähig sind, daß dagegen aber in stark gesalzener Sauerrahmbutter (etwa 4 bis 6 % NaCl) eine rasche Abtötung des Erregers erfolgt. Meerschweinchen, mit 10, ja sogar 5 Tage alter salz- und erregerehaltiger Butter geimpft, zeigten keinerlei pathologisch-anatomische Veränderungen mehr bei der Sektion.

b) Der sicherste Nachweis zur Feststellung der Tuberkelbakterien im Material ist der Tierversuch, der nach Mitscherlich, Reuß und Gürtürk (30) dem Kulturversuch um mehr als das Doppelte überlegen ist. Gleichlautend äußern sich auch andere Autoren, von denen hier Beller (2) und Daigeler (10) genannt seien. Dazu muß festgestellt werden, daß der Tierversuch unter Umständen versagen kann, wie dies aus den Veröffentlichungen von Viatschko (43), Buss u. Lang (9) und Beller (2) ersichtlich ist. In dieser Hinsicht sind auch die Untersuchungen von Seemann (43) von besonderem Interesse. Dieser Autor hat in einer Versuchsgruppe mehrere Meerschweinchen mit Molkeemilch beimpft und nur bei einem Teil der mit gleichem Material infizierten Tiere eine tuberkulöse Infektion nachweisen können.

c) Zum Nachweis der Hoherhitzung dient die Peroxy-

daseprobe mit Guayaktinktur neu, die mit ziemlicher Sicherheit anzeigt, ob bei der molkereinmäßigen Behandlung der Milch die Erhitzungstemperaturen über oder unter 81°C lagen.

Zur Feststellung der Kurzzeiterhitzung wird die Phosphataseprobe angewandt, die ebenfalls nach Klimmer-Schönberg zu guten Ergebnissen führt. Die Phosphatase ist ein Enzym, das von Milchdrüsenzellen gebildet wird und stets in roher Milch vorhanden ist. Die Phosphatase spaltet aus organischen Phosphorverbindungen anorganischen Phosphor ab und wird in bestimmter Weise durch verschiedene Hitzegrade und verschieden lange Einwirkung der Hitze beeinflusst und erlaubt daher bei Vorhandensein oder Fehlen in erhitzter Milch oder in molkereinmäßig behandelten Milchprodukten eine Beurteilung der Pasteurisierung. Ab 38°C wird sie langsam zersetzt und unwirksam. Ihre Zersetzungszeit verringert sich bei 80°C bis auf 0,45 Sekunden. Nach neueren Arbeiten liegt die Phosphatasezerstörung in demselben Pasteurisierungsbereich, der zur Vernichtung der meisten in der Milch vorkommenden Bakterien nötig ist.

Ritter (39) gibt an, daß 99% der Phosphatase in der Milch zerstört werden bei 62°C in 15 Minuten, bei 70°C in 27 Sekunden und bei 71°C in 10 Sekunden. Im Vergleich dazu stellt er die Abtötung von Tuberkelbakterien bei 60°C in 15–20 Minuten und bei 70°C in 10 Sekunden. Damit weist er nach, daß alkalische Phosphatase in der Milch etwas weniger leicht zerstört wird als die darin vorkommenden pathogenen Keime, vor allem bovine Tuberkelbakterien. Die saure Milchphosphatase soll noch temperaturbeständiger sein.

Er beobachtet aber auch Störungen des Testes, indem er feststellt, daß bei kurzzeitiger Pasteurisation des Rahms eine gewisse „Regenerierung“ des Enzyms stattfindet.

Procter (37) vertritt die gleiche Ansicht, wenn er behauptet, der Phosphatasetest sei nicht nur brauchbar als Nachweis für Unterschreitung der üblichen Erhitzungsstärke und -zeit, sondern er mache sich auch nützlich zum Nachweis für Überschreitung der üblichen Mindestgrenzwerte, da infolge von Freimachung von Sulfhydrylsubstanzen die Phosphatasereaktion wieder positiv wird.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde der von Kay und Graham (20) entwickelte Phosphatasetest angewandt, der darauf beruht, daß die Milchphosphatase die Fähigkeit hat, Phenylester der Phosphorsäure aufzuspalten, wobei Phenol in Freiheit gesetzt wird. Dieses freie Phenol kann dann mit bestimmten Reagentien durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Mit steigender Erhitzungstemperatur und Verlängerung der Erhitzungsdauer der Milch wird die Phosphatase in zunehmendem Maße geschwächt und schließlich ganz zerstört. Damit nimmt auch die Fähigkeit der Phosphatase, aus dem Phenylester der Phosphorsäure Phenol abzuspalten, ab, wodurch die Farbreaktion schwächer wird. Die Intensität der auftretenden Färbung beim Phosphatasetest ist somit ein Maßstab für den Phosphatasegehalt der Milch. Ordnungsgemäß kurzzeit- oder dauererhitzte Milch ergibt eine negative Phosphatasereaktion.

C. Eigene Untersuchungen

I. Arbeitsauftrag

Herr Professor Dr. Keller beauftragte mich, in seinem Institut Untersuchungen an verschiedenen Butterproben auf das Vorhandensein virulenter Tuberkelbakterien durchzuführen. Die Fragestellung lautete:

1. Kommen in öffentlich zum Verkauf gelangender Butter virulente Tuberkelbakterien vor?
2. Ist das Ausgangsmaterial zur Herstellung dieser Butter pasteurisiert worden?
3. In welchem Verhältnis stehen etwa vorhandene Tuberkelbakterien zum Phosphatasegehalt des Ausgangsmaterials?

Das Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde stellte mir zur Beantwortung dieser Fragen die nötige Anzahl von Petraghani-Nährböden sowie Versuchstiere (Meerschweinchen) zur Verfügung.

Meine Arbeit bestand nun darin, mit einem aus den di-

versen Butterproben hergestellten Extrakt sowohl die Nährböden als auch die Meerschweinchen zu impfen und nach einer 6-wöchigen Versuchszeit die getöteten Tiere zu sezieren und die Nährbodenkulturen zu untersuchen. Auch die sonstigen zur **Untersuchung erforderlichen Geräte** und Reagentien wurden mir vom hiesigen Institut zur Verfügung gestellt.

II. Herkunft des zu untersuchenden Materials.

Das Ausgangsmaterial für meine Untersuchungen waren von mir in verschiedenen Gießener Ladengeschäften eingekaufte Butterproben, die sämtlich aus in Pergamentpapier verpackten 250 oder 125 Gramm-Päckchen stammten und die Aufschrift „Deutsche Markenbutter“ trugen. Hergestellt und nach Gießen geliefert war die Butter von 20 verschiedenen Molkereien aus Süd- und Norddeutschland, der größte Teil aus dem Gebiete Oberhessens. Soweit einzelne der von mir angesetzten Proben vom selben Hersteller stammten, waren sie zeitlich um mehrere Tage voneinander getrennt eingekauft worden.

III. Methodik.

Sämtliche Butterproben wurden in kleine sterile Zylindergläser hineingedrückt und anschließend in einem Wasserbad bei 37—38° C erwärmt und dadurch geschmolzen. Um eine bessere Abscheidung des Butterserums vom Butterfett zu erzielen, wurden die Gläschen mit Inhalt bei gleicher Tem-

peratur und etwa 500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das noch flüssige Butterfett wurde von dem darunter abgesetzten Butterserum abgossen. Ein Teil des nicht weiter vorbehandelten Serums wurde mit dem „Lactognost“-Reagenz der Firma Heyl & Co., Berlin-Steglitz und Hildesheim, nach einer dem Präparat beiliegenden Gebrauchsanweisung auf das Vorhandensein von Phosphatase geprüft:

In ein Reagenzglas füllt man 10 ccm lauwarmes (37 bis 39 °C), destilliertes Wasser und läßt darin je eine Tablette „Lactognost“ I und II zerfallen. Gegebenenfalls werden die Tabletten mit einem Glasstab zerdrückt. Das Lösen der „Lactognost“-Tabletten soll möglichst kurz vor dem Ansetzen der Probe erfolgen. Dann wird das zu prüfende Serum (1 ccm) hinzugegeben und das Ganze gut durchgemischt. Zur Herstellung einer Kontrollprobe benutzt man ein durch Erhitzen auf 85 °C phosphatasefrei gemachtes und wieder abgekühltes Serum, mit dem man ein zweites Reagenzglas wie oben beschrieben beschickt. Sodann werden beide Reagenzgläser in einem Wasserbad auf 37 °C angewärmt und darin oder in einem Brutschrank mindestens eine Stunde bei 37 °C gehalten. Nach Ablauf der genannten Zeit gibt man in jedes Reagenzglas einen Dosierlöffel „Lactognost“ III (gestrichen voll), läßt 10 Minuten stehen, mischt dann durch mehrmaliges Stürzen des Reagenzglases gut durch und vergleicht nach weiteren 3 bis 5 Minuten eine im ersten Reagenzglas gegebenenfalls entstandene Blaufärbung mit der Kontrollprobe (zweites Reagenzglas) und bestimmt an Hand des beigefügten Farbstufenschemas die Farbstufe.

Nach Vorliegen des Ergebnisses dieser Reaktion wurde

von jeder Probe 1 ccm des unvorbehandelten Serums einem Meerschweinchen subcutan in die Gegend des rechten Knie-faltenlymphknotens injiziert. Proben mit positiver Phos-phatasereaktion wurden in gleicher Weise an je zwei Ver-suchstiere appliziert. Letzteres geschah wegen der theoretisch größeren Möglichkeit des Vorhandenseins von virulenten Tuberkelbakterien. Die beimpften Tiere wurden nach einer 6-wöchigen Beobachtungszeit getötet und seziert.

Das übrige Butterserum wurde bei 2000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang zentrifugiert. Der dabei entstandene Bodensatz wurde nach Abgießen der darüberstehenden Flüs-sigkeit mit 2 ccm einer 2 %igen Schwefelsäure vermengt. Diese wirkte 10 Minuten lang auf das Material zwecks Ab-tötung der Begleitkeime ein. Nach abermaligem Zentrifu-gieren bei 2000 Umdrehungen pro Minute auf die Dauer von 15 Minuten wurde der auf diese Weise entstandene Boden-satz sofort auf Petraghani-Nährböden verimpft. Für jeden Versuch wurden je 2 Petraghani-Nährböden ohne und 2 mit Glycerinzusatz, modifiziert nach Witte, verwendet. Nach 6-wöchigem Aufenthalt der beimpften und mit Paraffin ver-schlossenen Röhrchen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37—38 ° C wurden diese auf das Wachstum etwaiger Tu-berkelbakterien-Kolonien untersucht. Die verwendeten Nähr-böden sowie die Technik des Beimpfens blieben im Rahmen dieser Arbeit stets die gleichen und sollen an dieser Stelle beschrieben werden:

Nährbodenrezept:

150,0 ccm frische Kuhmilch
12,0 g Bohnenmehl
2,0 g Pepton
180,0 g Kartoffeln = 2 mittelgroße Kartoffeln,
in kleine Stückchen geschnitten,

werden gut durchgemischt, 1 Stunde gekocht und zwischen-
durch öfter geschüttelt.

Nach Abkühlung auf 60 ° C werden

150,0 ccm Fleischwasser (hergestellt aus
400,0 ccm Stammbouillon +
1600,0 ccm Aqua fontana + 10,0 g NaCl
+ 20,0 g Pepton (Witte)

so wie ein Gemisch aus

8 ganzen Eiern + 2 Eigelb, die vorher in einem sterilen
Gefäß mit Glasperlen gut geschüttelt worden waren,
zugesetzt.

Das Ganze wird gut umgeschüttelt und durch ein Mulltuch
geseiht. Dem Filtrat werden dann

20,0 ccm einer 2 %igen Malachitgrünlösung beigegeben.

Diese Lösung war am Tage vorher aus 0,4 g Malachitgrün
+ 20,0 ccm Aqua dest. angesetzt worden.

Bei Nährböden mit Glyzerinzusatz werden jetzt noch
24,0 ccm Glyzerin zugefügt.

Nach guter Durchmischung wird die erhaltene Nährboden-
flüssigkeit zu je 4—5 ccm in sterile Reagenzröhrchen abge-
füllt und diese sofort mit einem sterilen Zellstoffpfropfen
verschlossen. Im Wärmeschrank werden die Röhrchen so-

dann in Schräglage einer Temperatur von 80—83 ° C für die Dauer von 2 Stunden ausgesetzt und nach Abschaltung der Beheizung noch weitere 12—18 Stunden in dem sich abkühlenden Schrank belassen. Hierdurch wird eine gute Festigkeit der zu beimpfenden Nährböden erreicht. Von Wichtigkeit ist, daß zur Vermeidung des Austrocknens der Nährböden auf den Boden des Wärmeschrankes eine offene Schale mit Wasser gestellt wird.

Technik des Beimpfens der Nährböden:

Zum Anlegen der Kulturen wurde mit einer sterilen Drahtöse nach Abflammen der Röhrchenöffnung etwas von dem zu untersuchenden Material entnommen und auf Petragrani-Nährböden übertragen. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, daß das Material gut in den Nährboden eingegeben wurde, ohne diesen jedoch zu verletzen. Anschließend wurde das obere Ende des beimpften Nährbodenröhrchens einige Male durch die Flamme gezogen und mit dem ebenfalls abgeflamnten Zellstoffpfropfen verschlossen. Dieser wurde so tief eingedrückt, daß auf den Pfropfen noch eine etwa 1 cm hohe Paraffinschicht gegossen werden konnte. Nach Erstarren des Paraffins wurden die beimpften Röhrchen in den Brutschrank bei 37—38 ° C eingestellt.

IV. Vorversuch.

Um das richtige Funktionieren oben beschriebener Methodik zu überprüfen, wurde ein Kontrollversuch angesetzt. Zu diesem Zweck wurde der abgeschöpfte saure Rahm von 4

Litern guter Vollmilch mit etwa 10 ccm stark tuberkulösen Eutersekrets infiziert und gut durchgemischt. Aus der infizierten Sahne wurden etwa 100 g Butter in einem kleinen Handbutterfäßchen hergestellt. In 4 gleiche Portionen geteilt, wurden die einzelnen Mengen nach obiger Beschreibung in Butterserum und Butterfett geschieden. Eine der 4 Portionen blieb unverändert, da sie ohnehin schon eine Verdünnung von 1 : 50 (10 ccm tuberkulöses Eutersekret : 500 ccm Rahm) darstellte. Von den übrigen 3 Serumpportionen wurden nun mit steriler physiologischer Kochsalzlösung weitere 3 Verdünnungen hergestellt (im Verhältnis 1 : 100, 1 : 500 und 1 : 1000). Das Gleiche geschah mit dem abgeschiedenen Butterfett, allerdings nicht mit physiologischer Kochsalzlösung, sondern mit sterilem, ca. 5 Minuten lang gesottenen Butterfett. Mit 1 ccm dieser Serumverdünnungen wurde je 1 Meerschweinchen geimpft. Desgleichen wurde mit den Fettverdünnungen verfahren. Es wurden also insgesamt 8 Tiere geimpft; je 2 mit der gleichen Verdünnung von Butterserum oder Butterfett.

Zur Kontrolle dieses Vorversuches wurde je 1 Tier mit vorher durch Erhitzen steril gemachtem Butterserum bzw. Butterfett geimpft.

Das Ergebnis des Vorversuches war:

Alle 8 mit Verdünnungen geimpften Tiere wurden — nach 6 Wochen getötet und sezirt — mehr oder weniger stark mit Tuberkulose infiziert befunden.

Die 2 mit sterilem Material geimpften Tiere wiesen keinerlei tuberkulöse Veränderungen auf.

Folgende Tabelle soll den Vorversuch veranschaulichen:

Verdünnung	mit Serum geimpfte Tiere	mit Fett geimpfte Tiere
1 : 50	+++	+++
1 : 100	+++	+++
1 : 500	++	++
1 : 1000	+	+
steril	—	—

Erläuterung der Tabelle:

Tuberkulöse Veränderungen in

+++ = Kniefaltenlymphknoten, Leber und Lunge,

++ = Kniefaltenlymphknoten und Leber,

+ = Kniefaltenlymphknoten,

— = keine Veränderungen.

Mit dem Resultat des Vorversuches ist der Beweis erbracht, daß

- a) die oben beschriebene Methodik anwendbar ist, und
- b) daß Tuberkelbakterien in gleicher Weise sich sowohl im Butterserum als auch im Butterfett aufhalten können.

Da nun das Bearbeiten des Fettes größere Schwierigkeiten bereitet, und da außerdem die Phosphatasereaktion mit reinem Fett schlecht durchführbar ist, wurde für die nun folgenden Hauptversuche als Material nur das Butterserum gewählt. Das Ergebnis wird ohnehin dadurch nicht beeinträchtigt.

V. Hauptversuch

In der unter dem Kapitel „Methodik“ beschriebenen Weise wurden nun 35 verschiedene Proben der Molkereibutter untersucht, die unter der Bezeichnung „Deutsche Markenbutter“ in allen Lebensmittel- und Molkereiwarengeschäften Gießens öffentlich verkauft wird.

Zur Veranschaulichung der Versuchsergebnisse sei folgende tabellarische Übersicht beigelegt:

1	2	3				4
lfd. Nr. des Vers.	Phosphatase im Serum	beimpfte Nährböden				Tierversuch mit Meerschweinchen
		ohne Glyz.		mit Glyz.		
		A	B	C	D	
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—

1	2	3				4	
lfd. Nr. des Vers.	Phosphatase im Serum	beimpfte Nährböden				Tierversuch mit Meerschweinchen	
		ohne Glyz.		mit Glyz.			
		A	B	C	D		
7	—	—	—	—	—	—	
8	—	—	—	—	—	—	
9	—	—	—	—	—	—	
10	—	—	—	—	—	—	
11	—	—	—	—	—	—	
12	+	—	—	—	—	a) b)	— —
13	—	—	—	—	—	—	
14	++	—	—	—	—	a) b)	— —
15	—	—	—	—	—	—	
16	—	—	—	—	—	—	
17	—	—	—	—	—	—	
18	—	—	—	—	—	—	
19	—	—	—	—	—	—	
20	—	—	—	—	—	—	
21	—	—	—	—	—	—	
22	—	—	—	—	—	—	
23	—	—	—	—	—	—	

1	2	3				4
Ifd. Nr. des Vers.	Phosphatase im Serum	beimpfte Nährböden				Tierversuch mit Meerschweinchen
		ohne Glyz.		mit Glyz.		
		A	B	C	D	
24	—	—	—	—	—	—
25	++	—	—	—	—	a) + Leber, Milz b) + Lkn.
26	—	—	—	—	—	+ Leber, Milz
27	--	—	—	—	—	—
28	--	—	—	—	—	—
29	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—
31	++	—	—	—	—	a) — b) —
32	++	—	—	—	—	a) ++ Leber, Milz b) —
33	—	—	—	—	—	—
34	—	—	—	—	—	—
35	—	—	—	—	—	—

Aus der Spalte 2 der Tabelle ist ersichtlich, daß der Phosphatasetest im Versuch 12 schwach positiv verlaufen ist. Ein stark positives Ergebnis dagegen war bei den Versuchen 14, 25, 31 und 32 zu verzeichnen. Alle übrigen Versuche verliefen negativ. In den positiven Proben ist also das Enzym Phosphatase qualitativ nachgewiesen worden.

Aus der Spalte 3 obiger Tabelle geht hervor, daß auf sämtlichen beimpften Petragrani-Nährböden nach einer Bebrütungszeit von 6 Wochen kein erkennbares Wachstum etwaiger Tuberkelbakterienkolonien festgestellt wurde.

In der Tabellenspalte 4 sind die Impfversuche an Meerschweinchen verzeichnet. Von jeder Probe mit positivem Phosphatasetest wurden je 2 Tiere geimpft [a) und b)].

Beide Tiere des Versuches 25 sowie das Meerschweinchen a) des Versuches 32 wiesen bei der Sektion pathologisch-anatomische Veränderungen an verschiedenen Organen auf. Bei allen diesen Tieren waren die rechten Kniefaltent lymphknoten, in deren Umgebung die Injektion des Untersuchungsmaterials erfolgt war, stark geschwollen und zum Teil verkäst. Außerdem waren, außer beim Tier 25 b), die Lebern und Milzen derart verändert, daß in den Organen mehrere (3 bis 7) etwa stecknadelspitzen- bis stecknadelkopfgroße weiße Herdchen festzustellen waren. Ein ähnlicher pathologisch-anatomischer Befund wurde bei dem mit dem Untersuchungsmaterial 26 infizierten Versuchstier erhoben. Wie aus der Tabelle ersichtlich, war die Phosphatase-Reaktion in diesem Fall negativ verlaufen. Von den veränderten Organen, insbesondere von den darin befindlichen Herdchen, wurden Abstrichpräparate hergestellt und nach Ziehl - Neelsen (amtliche Vorschrift) gefärbt. Auch eine Färbung nach Buss wurde angefertigt. Die mikroskopische Untersuchung der Abstriche ergab in allen Fällen das Vorhandensein von alkohol- und säurefesten, schlanken, granulierten Stäbchen.

Pfalzgraf (36), der Meerschweinchenversuche mit

apathogenen Mykobakterien durchgeführt hat, hat bei einem von 23 Versuchstieren bei der Durchführung der Sektion stecknadelkopfgroße und größere Herde z. B. in Leber und Milz festgestellt, die, wie seine weiteren Untersuchungen ergaben, durch apathogene Mykobakterien verursacht waren. Weiterhin ergibt sich aus dem Schrifttum, daß eine morphologische Unterscheidung von Tuberkelbakterien und säurefesten Saprophyten nach Ziehl - Neelsen - Färbung nicht immer gelingt (Eis (14)).

Nicht zuletzt muß darauf verwiesen werden, daß die apathogenen Mykobakterien verhältnismäßig hitzebeständig sind. Dies ist deutlich aus der Arbeit von Neubauer (32) ersichtlich, in der der Differenzierungsschlüssel der Mykobakterien nach den Angaben von Bergey (3) in einem sehr übersichtlichen Schema dargestellt ist. Diese Einwände sowie die in der vorliegenden Arbeit gemachten Schrifttumsangaben geben keine 100 %ige Berechtigung, auf Grund der von mir durchgeführten Tierversuche in den Fällen 25, 26 und 32 auf lebende Tuberkelbakterien in den untersuchten Butterproben zu schließen.

In den übrigen Fällen Nr. 1—24, 27—31 und 33—35 hatten die Tierversuche ein negatives Ergebnis.

VI. Auswertung der Versuchsergebnisse.

Es wurden 35 Butterproben auf Phosphatase und die Anwesenheit von lebenden Tuberkelbakterien mittels Kultur- und Tierversuch geprüft.

In 30 Fällen führte die Phosphatase-Reaktion zu einem negativen = 85,71 %, in einem Fall zu einem schwach positiven = 2,86 % und in 4 Fällen = 11,43 % zu einem stark positiven Ergebnis. In 14,29 % hatte also eine ausreichende Sterilisation des für die Butterherstellung verwendeten Ausgangsmaterials nicht stattgefunden.

Kulturell konnten mit glyzerinhaltigen und glyzerinfreien Petagnani-Nährböden Tuberkelbakterien in den untersuchten 35 Butterproben nicht nachgewiesen werden.

In den Versuchen 1—11, 13, 15—24, 26—30 und 33—35, die sämtlich phosphatasen negativ waren, führte der Tierversuch, mit Ausnahme von Fall 26, zu negativen Ergebnissen = 96,66 %

In einem Fall (26) wurden durch die Sektion pathologisch-anatomische Veränderungen in Leber und Milz festgestellt, die für eine tuberkulöse Infektion des Versuchstieres sprachen. In Organausstrichpräparaten wurden alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen. Die bereits besprochenen Einwendungen lassen jedoch nicht zu, mit Sicherheit auf Tuberkulose zu schließen.

Die Butterproben 12, 14, 25, 31 und 32 waren phosphatase-positiv. Diesem Befund zufolge war das zur Butterherstellung verwendete Ausgangsmaterial nicht ausreichend sterilisiert worden. Der Tierversuch auf Tuberkulose mit den Proben 12, 14 und 31 verlief negativ. Dagegen ergab die Sektion der mit den Butterproben 25 und 32 geimpften Meerschweinchen einen auf Tuberkulose hinweisenden pathologisch-anatomi-

schen Befund. Wenn auch durch die bakterioskopische Untersuchung von Ausstrichpräparaten aus dem veränderten Organmaterial alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen wurden, so kann aus den bereits besprochenen Erwägungen heraus doch nicht mit unbedingter Sicherheit auf eine tuberkulöse Infektion der Meerschweinchen durch diese Butterproben 25 und 32 geschlossen werden.

Trotz dieser Einschränkungen aber zeigen die durchgeführten Untersuchungen, daß bei nicht ausreichend erhitztem Ausgangsmaterial für die Butterherstellung mit rund 40 %iger Wahrscheinlichkeit die Möglichkeit besteht, daß - wie säurefeste Saprophyten - lebende Tuberkelbakterien in der Butter sein können. Eine solche Butter stellt dann als Infektionsquelle eine Gefahr für den Konsumenten dar. Hat dagegen eine ausreichende Pasteurisierung des für die Buttergewinnung benötigten Rahmes stattgefunden, so ist nur in ganz wenigen Fällen (3,33 %) damit zu rechnen, daß lebende Tuberkelbakterien in der Butter vorkommen.

VII. Schlußfolgerungen

Die durchgeführten Untersuchungen führen zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) a) Ist der für die Butterherstellung benötigte Rahm ausreichend pasteurisiert, dann ist die Möglichkeit des Vorkommens von lebenden Mykobakterien sehr gering. In vorliegenden Untersuchungen wurden 3,33 % positiver Fälle festgestellt.

- b) Ist eine ausreichende Erhitzung des zur Buttergewinnung verwendeten Ausgangsmaterials nicht erfolgt, können Mykobakterien - und damit Tuberkelbakterien und andere pathogene Erreger - in bis zu 40 % der Fälle in der Butter vorkommen.
 - c) Die Phosphataseprobe bei der Butter hat sich als Indikator für eine Überprüfung der Pasteurisierung des Ausgangsmaterials bewährt.
2. Solange durch die Tuberkulose-Bekämpfung eine vollkommene Tilgung der Rindertuberkulose noch nicht erreicht ist, darf nur Butter in den Handel gebracht werden, die aus ausreichend pasteurisiertem Ausgangsmaterial hergestellt ist.
-

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Keller, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und das der Arbeit jederzeit entgegengebrachte Interesse.

Ebenso bin ich sehr zu Dank verpflichtet Herrn Dr. Buss und Herrn Dr. Lang für die wertvolle Hilfe und allen Institutsangehörigen für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

D. Literaturverzeichnis

1. Albus, Untersuchungen von Speisequark auf infektionstüchtige Tuberkelbakterien.
Inaug.-Dissert. Gießen 1954.
2. Beller, Leistungsfähigkeit und Bedeutung von Kultur- und Tierversuch für die Typenbestimmung bei der Tuberkulose.
Zbl. f. Bakt. 154, 21 (Stern) 1949.
3. Bergey's Manual of determinative Bacteriology.
Baltimore 1948.
4. Bingel, Tuberkulosedesinfektion der Milch durch Pasteurisierung unter Bedingungen des Laboratoriums-experimentes.
Zbl. f. Bakt. 159, 427, 1952/53.
5. Blindow, Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt kurzzeiterhitzter Handelsmilch.
Inaug.-Dissert. Gießen 1951.
6. Brugsch, Was für Erfahrungen bestehen bezgl. d. Infektiosität von aus roher Milch gewonnenen Produkten wie Butter und Käse (Fütterungstuberkulose). Die Milchwissenschaft 6, 370, 1951.
7. Brusafero, Über Butter und Tuberkulose.
Ztschr. f. Fl.- u. Milchhyg. 6, 13, 1896.

8. Buss, Tuberkelbakterien in pasteurisierter Vollmilch.
Der Lebensmitteltierarzt 3, 7, 1952.
9. Buss u. Lang, Rindertuberkulose und Milchhygiene.
Der Lebensmitteltierarzt 1, 52, 1950.
10. Daigeler, Die Leistungsfähigkeit der bakteriologischen Untersuchungsmethoden bei der Untersuchung von Milch- u. Trachealschleimproben auf Tuberkelbakterien.
DTW 59, 258, 1952.
11. Domagk, zitiert nach Tuberkulose - Jahrbuch 1950/51.
12. Ehrlich, Wie haben sich die in Deutschland amtlich zugelassenen Pasteurisierungsverfahren der Milch hinsichtlich der Abtötung von Tuberkelbakterien in der Praxis bewährt?
Ztschr. f. Fl.- u. Milchhyg. 52, 152, 1942.
13. Eikmeier, Untersuchungen üb. d. Tuberkelbakteriengenh. hocherhitzter Molkereimilch.
Inaug.-Dissert. Gießen 1950.
14. Eis, Untersuchungen über die fluoreszenzmikroskopische Differenzierung von Tuberkelbakterien und apathogenen Mykobakterien in der Milch.
Inaug.-Dissert. Gießen 1954.
15. Goerttler u. Weber, Bovine Tuberkulose als Ursache humaner Tuberkulose.
Die Rindertuberkulose 3, 29, 1954.
16. Greve, Milcherhitzung u. Tuberkulosebekämpfung.
Der Lebensmitteltierarzt 1, 17, 1950.

17. Herzer, Untersuchungen über die Hitzeresistenz von 44 bovinen Tuberkelbakt.-Stämmen bei 75—76° in Milch. Inaug.-Dissert. Gießen 1950.
18. Kästli, Die Möglichkeit der Übertragung von Tuberkelbakterien durch den Konsum von Milch u. Milchprodukten. Milchwissenschaft 7, 382—383, 1952.
19. Kästli u. Binz, Die Lebensfähigkeit von Mycobacterium tuberculosis in verschiedenen Käsesorten. Die Milchwissenschaft 4, 391, 1949.
20. Kay u. Graham, J. Dairy Res. 5, 54, 1933.
21. Keller u. Albus, Tuberkelbakterien im Speisequark. Der Lebensmitteltierarzt 5, 193, 1954.
22. Kemkes, Fragen der Milchhygiene. Die Milchwissenschaft 3, 108, 1948.
23. Kliewe u. Schuppener, zitiert nach Klimmer-Schönberg.
24. Klimmer-Schönberg, Milchkunde und Milchhygiene. 6. Aufl. 1951, Schaper-Verlag, Hannover.
25. Kollmann, Zum Nachweis von Tuberkelbakterien in saurer Milch und Sauerquarg. Der Lebensmitteltierarzt 2, 180, 1951.
26. Larmola, Über die Hitzeempfindlichkeit der Tuberkelbakterien. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 148, 151, 1943.
27. Maas u. Blum, Untersuchungen über die Abtötung von Tuberkelbakterien durch die Kurzzeiterhitzung in Sammelmolkereien. Monatshefte der Vet. Medizin 9, 104, 1954.

28. Markl, Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbazillen in der Wiener Marktbutter und Margarine. Fl.- u. Milchhygiene 12, 330, 1902.
29. Meyn, Untersuchungen über die Wirkung der Kurzzeiterhitzung an Großleistungserhitzern des Milchhofes Leipzig. DTW 43, 737, 1935.
30. Mitscherlich, Reuß u. Gürtürk, Der Einfluß der Vorbehandlung von tuberkulösem Material auf die Sicherheit des Nachweises von Tuberkelbakterien in Kultur- u. Tierversuch. Zbl. f. Bakt. 158, 97, 1952.
31. Munz, Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt kurzerhitzter Molkereimilch mit Hilfe der Zentrifugiermethode, der Alkoholprobe und der Züchtung auf Petragani-Nährböden, mod. nach Witte. Inaug.-Dissert. Gießen 1949.
32. Neubauer, Untersuchungen über das Vorkommen von Mykobakterien im Schafkot und deren Differenzierung. Inaug.-Dissert. Gießen 1953.
33. Obermüller, Über Tuberkelbazillenfunde in der Marktbutter. Fleisch- u. Milchhygiene 7, 217, 1897.
34. Petri, Bemerkungen zu den Arbeiten des Herrn Dr. Obermüller über Tuberkelbazillenfunde in der Marktbutter. Fl.- u. Milchhyg. 8, 35, 1898.
35. Pettersson, Über die Lebensbedingungen des Tuberkuloseerregers in der Salzbutter. Fleisch- u. Milchhygiene 14, 62, 1904.

36. Pfalzgraf, Beitrag zur unspezifischen Tuberkulinallergie von mit apathogenen Mykobakterien infizierten Meerschweinchen.
Inaug.-Dissert. Gießen 1956.
37. Procter, Die Untersuchung von sterilisierter Milch.
Milchwissenschaft 6, 246, 1951.
38. Rabinowitsch, Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbazillen in der Marktbutter.
Fleisch- u. Milchhygiene 8, 35, 1898.
39. Ritter, Die Verwendung der Phosphataseprobe im milchwirtschaftlichen Laboratorium.
Die Milchwissenschaft 7, 301—308, 1952.
40. Roth, Über das Vorkommen von Tuberkelbazillen in der Butter. Fl.- u. Milchhyg. 5, 56, 1895.
41. Schönberg, Zur zwingenden Notwendigkeit der Ausstattung der Milcherhitzer in Molkereien mit automatischen Temperaturreglern und Umschaltvorrichtungen.
Der Lebensmitteltierarzt 2, 81, 1951.
42. Seelemann, Die umstrittene Milchpasteurisierung.
Südd. Molkereizeitung 70, 920, 1949.
43. Seelemann, Prüfungen an Hoch- u. Kurzzeiterhitzern. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 3, 11, 1951.
44. Seelemann, Pilz u. Meyer, Pro oder contra Kurzzeiterhitzung der Milch.
Monatshefte prakt. Tierheilkde. 3, 142, 1951.
45. Seiffert, Über Milchschnitz und seine Bekämpfung.
Fl.- u. Milchhyg. 19, 370, 1909.

46. Trendtel, Probleme der modernen Milchhygiene u. die Versorgung zerstörter Städte mit Qualitätsmilch.
Zbl. f. Bakt. 158, 296, 1952.
47. Tuberkulose-Jahrbuch 1953/54.
48. Viatschko, Die Brauchbarkeit des syrischen Goldhamsters als Versuchstier zum Tuberkulose-Nachweis.
Tierärztliche Umschau 4, 213, 1949.
49. Wagener, Berichte des Arbeitsausschusses für Milch und Tiertuberkulose. Tbc.-Jahrbuch 1950/51.
50. - - - Trinkmilch und Tuberkulose.
Tbc.-Jahrbuch 1951/52.
51. - - - Milchhygiene und Tuberkulose.
Zbl. f. Bakt. 158, 293, 1952.
52. Wagener u. Eberhardt, Die Rindertuberkulose u. die milchhygienische Situation in nordwestdeutschen Städten.
Der Lebensmitteltierarzt 3, 89, 1952, (Ref.)
53. Wagener u. Reuß, Die gegenwärtige Bedeutung der bovinen Infektion für die Entstehung der Kindertuberkulose in Deutschland.
BMTW 66, 231, 1953.

Lebenslauf

Am 1. März 1928 wurde ich als Sohn des Bankkaufmanns Leopold Wuttke und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Porawski, in Posen geboren.

Im Jahre 1934 eingeschult, besuchte ich die Volksschule und von 1940 ab die Oberschule in Posen. 1944 im März als Luftwaffenhelfer eingezogen, wurde ich 1945 im Februar in Berlin entlassen, nachdem meine Einheit sich von Posen zurückgezogen hatte. Meine Eltern fand ich nach ihrer Flucht in Leipzig wieder. Im März 1945 wurde ich von dort aus zum Arbeitsdienst einberufen, geriet in Gefangenschaft und kehrte im August 1945 wieder. In Leipzig beendete ich dann die Oberschule und bestand im März 1947 die Reifeprüfung.

Anschließend ging ich nach Gießen, bewarb mich hier laufend zum Studium der Veterinärmedizin und wurde zum Sommersemester 1950 zugelassen. Im Frühjahr 1952 bestand ich die Tierärztliche Vorprüfung und im Mai 1955 die Tierärztliche Prüfung. Nach Ableistung der vorgeschriebenen Praktikantenzeit wurde mir am 18. Dezember 1955 die Approbation als Tierarzt erteilt.

Druck: Wilhelm Diëckmann. Altenkirchen/Ww.